



Matrix Metalloproteinase 9 Induced in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells via Close Contact with Tumor-Associated Macrophages Contributes to Cancer Progression and Poor...

塚本, 修一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8873号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490098>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Matrix Metalloproteinase 9 Induced in Esophageal Squamous
Cell Carcinoma Cells via Close Contact with Tumor-Associated
Macrophages Contributes to Cancer Progression and
Poor Prognosis

腫瘍関連マクロファージとの密な接触によって食道扁平上皮癌細胞に誘導されるマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 は癌の進展や不良な予後に寄与する

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科病理学講座病理学分野 横崎 宏 教授)

塚本 修一

1. 緒言

腫瘍微小環境内に浸潤するマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (TAM) と呼ばれ、様々な種類のがんの進展に寄与することが知られている。申請者の研究室では食道扁平上皮癌 (ESCC) に於いて癌組織中の TAM 浸潤数が多い症例ほど予後が不良であることをヒト ESCC の手術検体を用いて報告した。その後、TAM が癌細胞の悪性形質に与える影響を解析するために *in vitro* で ESCC 細胞株と TAM 様細胞の間接共培養系を確立し、インターロイキン 8 (IL-8) や CC ケモカインリガンド 3 (CCL3) などの液性因子が ESCC 細胞の悪性形質を亢進させることを実験的に示し、実際の ESCC 組織でもこれらの因子の発現が高いことが不良な予後と有意に相関していることを見出した。一方で実際の癌組織中では癌細胞と TAM は接触ないしは極めて近接している像が確認できる。そこで、この直接接触環境に着目して新たに癌細胞株と TAM 様細胞の直接共培養系を確立した。従来の間接共培養系とは異なり直接共培養後の ESCC 細胞では、S100 カルシウム結合蛋白質 A8 及び A9 (S100A8/A9) やインターロイキン 7 受容体 (IL-7R) の遺伝子及び蛋白質発現が亢進し、これらの高発現が ESCC 患者の不良な予後や癌組織内の TAM 浸潤数と有意に相関することを示した。申請者はこの直接共培養後の癌細胞内でマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 (MMP9) の発現が亢進することに着目した。MMP9 はゼラチナーゼ B とも呼ばれる全長で 92kDa のプロテアーゼである。基底膜構成成分の IV 型コラーゲンやラミニンを分解することで、癌細胞の浸潤や転移に関与する他、細胞外マトリックスの再構築や血管新生に寄与することで種々のがんの進展に寄与する。ESCC でも MMP9 の高発現が癌の深達度や予後に関するとの報告があるが、TAM との相互作用に関連した報告はこれまでになかった。

2. 材料と方法

過去に確立した直接共培養系を用いて ESCC 細胞 (TE-9,-10,-11 細胞を使用) と TAM 様細胞を直接共培養し、共培養後の ESCC 細胞を用いてサイトカインアレイ、ELISA、ゼラチンゲルザイモグラフィ、リアルタイム PCR、ウェスタンブロッティング、運動・浸潤アッセイを行った。siRNA による ESCC 細胞内の *STAT3* mRNA ノックダウン実験や ESCC 細胞に対する PI3 キナーゼと p38MAP キナーゼの阻害、ヒトリコンビナント S100A8/A9 と IL-8 での刺激実験を行い MMP9 発現の上流因子を探索した。ヒト ESCC 手術材料を用いて MMP9 免疫組織化学を行い、癌組織に於ける MMP9 発現と臨床病理学的因子や予後との相関を調べた。

3. 結果

TAM 様細胞と共培養した後の TE-11 細胞では、単独培養後の TE-11 細胞に比して MMP9 や IL-8 など複数の液性因子の分泌が亢進することがサイトカインアレイによってわかった。ESCC 細胞 (TE-9, TE-10, TE-11) と TAM 様細胞を間接ならびに直接共培養し、直接共培養によってのみ用いた全ての ESCC 細胞で MMP9 の遺伝子発現及びタンパク質分泌が亢

進した。また分泌された MMP9 は酵素活性部位の立体構造が保たれたものであることがゼラチンゲルザイモグラフィによって示された。直接共培養によって ESCC 細胞内では Akt や Erk などのシグナル伝達タンパク質のリン酸化が亢進するが、それらの中で Stat3 のリン酸化が間接共培養では亢進せず、直接共培養によってのみ亢進していた。直接共培養によって ESCC 細胞の運動能や浸潤能が亢進するが、MMP9 阻害剤を加えると直接共培養によって亢進した TE-9 及び TE-10 細胞の運動能が有意に低下し、TE-9 及び TE-11 細胞の浸潤能が有意に低下した。STAT3 をノックダウンした ESCC 細胞や PI3 キナーゼ阻害剤、p38MAP キナーゼ阻害剤を作用させた ESCC 細胞では MMP9 の発現が減弱した。実際の ESCC 切除検体を用いた MMP9 免疫組織化学の解析では、浸潤先端部の癌細胞に MMP9 が発現する症例（癌細胞 MMP9 陽性症例）は有意に深達度が大きく、TAM の浸潤数が多かった。一方で癌部間質内の MMP9 発現の強弱は、これらの臨床病理学的因子とは関連しなかった。癌細胞 MMP9 陽性症例は、陰性症例に比して有意に全生存期間並びに無病生存期間が短かったが、間質の MMP9 発現の強弱はこれらの予後と関連しなかった。更に、浸潤先端部での癌細胞の MMP9 発現は、無病生存期間の独立した予後不良因子であった。次に、サイトカインアレイで直接共培養によって分泌が亢進することを見出した IL-8 に着目した。申請者の研究室は過去に ESCC 細胞と TAM の相互作用が両者の IL-8 発現を促進し、ESCC の進展に寄与することを報告した。過去の IL-8 免疫組織化学データを参照すると、癌細胞 MMP9 陽性症例はほぼ全例で IL-8 の受容体の一つである CXCR2 を高発現していた。ESCC 細胞（TE-9,-10,-11 細胞）にヒトリコンビナント IL-8 を添加すると、TE-10 細胞のみ MMP9 の分泌が有意に亢進した。また同様に ESCC 細胞にヒトリコンビナント S100A8/A9 を ESCC 細胞（TE-9,-10,-11 細胞）に作用させると、TE-10 細胞のみ MMP9 の分泌が有意に亢進した。

4. 考察

間接共培養ではなく直接共培養のみで ESCC 細胞の MMP9 発現が上昇したことから、細胞の接触や密接細胞間での何らかの機序が ESCC 細胞の MMP9 発現を誘導すると考えられる。運動・浸潤アッセイでは MMP9 が ESCC 細胞の運動能及び浸潤能に関与することが示されただけでなく、よく知られた細胞外マトリックスの分解以外にも癌細胞の運動を促進する機序が働いていることが示唆された。MMP9 発現の上流因子の探索では、PI3 キナーゼ-Akt 経路や p38MAP キナーゼ経路の関与もあるが、本研究で新たに Stat3 シグナル経路の重要性が示唆された。ヒト ESCC 組織の解析では、ESCC 細胞の MMP9 発現が TAM 浸潤と有意に相関しており、MMP9 発現における TAM の重要性が支持された。浸潤先端部 ESCC 細胞の MMP9 発現が予後不良と相関するのは *in vitro* の実験結果が示すような運動・浸潤能の亢進と関係しているだろうが、間質の MMP9 発現が予後と関連しなかったのは、間質内の MMP9 陽性細胞の全てが ESCC 微小環境に寄与しているわけではないことを示唆する。IL-8 は好中球において受容体 CXCR2 を介して MMP9 を発現誘導すること

が知られており、今回用いた ESCC 細胞株の中で TE-10 のみ IL-8 添加で MMP9 発現が上昇したのは、CXCR2/CXCR1 の発現比率が高かったことに起因するかもしれない。本研究では直接証明していないが、細胞外で MMP9 が IL-8 分子の一部を切断することで IL-8 の作用を飛躍的に高める効果が知られている。ESCC 微小環境でも癌細胞と TAM の相互作用を出発点として MMP9 と IL-8 の相互作用が癌細胞の運動や浸潤を大いに促進している可能性を提唱した。また ESCC の進展因子として過去に報告した S100A8/A9 も ESCC 細胞に MMP9 発現を誘導しうることから、S100A8/A9 の ESCC 進展機構の一つとして MMP9 発現誘導があることが示唆された。

5. 結論

申請者は、TAM が ESCC を進展させる機序の一つとして、TAM との直接接触が ESCC 細胞に MMP9 を発現誘導することを実験的及び免疫組織化学的に示した。更に ESCC 細胞の MMP9 発現が独立した無病生存期間不良因子であることを示した初の報告にもなった。今日の癌治療において TAM は標的細胞として、MMP9 は標的分子として注目されており、本研究の成果は ESCC においても TAM や MMP9 を治療標的とする有用性を支持するものとみなされた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第3368号	氏 名	塚本 修一
論文題目 Title of Dissertation	<p>Matrix Metalloproteinase 9 Induced in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells via Close Contact with Tumor-Associated Macrophages Contributes to Cancer Progression and Poor Prognosis</p> <p>腫瘍関連マクロファージとの密な接触によって食道扁平上皮癌 細胞に誘導されるマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 は癌の進展や不良な予後に寄与する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 伊藤 智雄 Chief Examiner</p> <p>副 査 桂 地 石 弘 Vice-examiner</p> <p>副 査 南 康博 Vice-examiner</p>		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

腫瘍関連マクロファージ (TAM) は様々な種類のがんの進展に寄与する。申請者の研究室では食道扁平上皮癌 (ESCC) に於いて癌組織中の TAM 浸潤数が多い症例ほど予後が不良であることを報告した。その後、*in vitro* で ESCC 細胞株と TAM 様細胞の間接共培養系を確立し、インターロイキン 8 (IL-8) などの液性因子が ESCC 細胞の悪性形質を亢進させることを示した。一方で実際の癌組織中では癌細胞と TAM は接触ないしは極めて近接している。この直接接触環境に着目して新たに癌細胞株と TAM 様細胞の直接共培養系を確立した。直接共培養後の ESCC 細胞では、マトリックスメタロプロテイナーゼ 9 (MMP9) の発現が亢進していた。MMP9 は基底膜構成成分を分解することで癌細胞の浸潤や転移に関与する他、細胞外基質の再構築や血管新生にも寄与する。本研究では TAM との相互作用で ESCC 細胞に発現誘導される MMP9 の意義について解析した。

用いた材料と方法は以下の如くである。ESCC 細胞 (TE-9,-10,-11 細胞を使用) と TAM 様細胞を直

接共培養し、共培養後の ESCC 細胞を用いてサイトカインアレイ、ELISA、ゼラチンゲルザイモグラフィ、運動・浸潤アッセイなどを行った。ESCC 細胞内の *STAT3* mRNA ノックダウン実験や IL-8 での刺激実験などを行い MMP9 発現の上流因子を探索した。ヒト ESCC 手術材料を用いて MMP9 免疫組織化学を行い、癌組織に於ける MMP9 発現と臨床病理学的因子や予後との相関を調べた。

得られた結果は次の如くである。TAM 様細胞と直接共培養した後の TE-11 細胞では、単独培養後の TE-11 細胞に比して MMP9 や IL-8 などの分泌が亢進していた。ESCC 細胞 (TE-9, TE-10, TE-11) と TAM 様細胞を間接及び直接共培養すると、直接共培養によってのみ全ての ESCC 細胞で MMP9 の遺伝子発現及びタンパク質分泌が亢進した。また分泌された MMP9 の酵素活性部位の立体構造は保たれていた。Akt などのシグナル伝達タンパク質の中で、Stat3 のリン酸化は間接共培養では亢進せず、直接共培養後のみ亢進していた。直接共培養によって ESCC 細胞の運動能や浸潤能が亢進するが、MMP9 阻害剤を加えるとそれらが打ち消された。*STAT3* をノックダウンした ESCC 細胞では MMP9 の発現が減弱した。ヒト ESCC 切除検体を用いた MMP9 免疫組織化学の解析では、浸潤先端部の癌細胞に MMP9 が発現する症例 (癌細胞 MMP9 陽性症例) は有意に深達度が大きく、TAM の浸潤数が多かった。一方で癌部間質内の MMP9 発現の強弱は、これらの因子とは相関しなかった。癌細胞 MMP9 陽性症例は、陰性症例に比して有意に全生存期間並びに無病生存期間が短かったが、間質の MMP9 発現の強弱は予後と相関しなかった。更に、浸潤先端部での癌細胞の MMP9 発現は、無病生存期間の独立した予後不良因子であった。過去の ESCC 免疫組織化学データを参照すると、癌細胞 MMP9 陽性症例はほぼ全例で IL-8 の受容体の一つである CXCR2 を高発現していた。ESCC 細胞 (TE-9, -10, -11 細胞) にヒトリコンビナント IL-8 を添加すると、TE-10 細胞のみ MMP9 の分泌が有意に亢進した。

間接共培養ではなく直接共培養のみで ESCC 細胞の MMP9 発現が上昇したことから、細胞の接触や密接細胞間での何らかの機序が ESCC 細胞の MMP9 発現を誘導すると考えられる。運動・浸潤アッセイでは MMP9 が ESCC 細胞の細胞外基質の分解を介した浸潤促進以外にも癌細胞の運動を促進する作用が示唆された。MMP9 発現の上流因子の探索では、新たに Stat3 シグナル経路の重要性が示唆された。ヒト ESCC 組織の解析では、ESCC 細胞の MMP9 発現が TAM 浸潤と有意に相関しており、MMP9 発現における TAM の重要性が支持された。間質内の MMP9 発現が予後と相関しなかったのは、MMP9 陽性間質細胞の全てが ESCC 微小環境に寄与してはいないことを示唆する。IL-8 は好中球に於いて受容体 CXCR2 を介して MMP9 を発現誘導する。今回用いた ESCC 細胞株の中で TE-10 のみ IL-8 添加で MMP9 発現が上昇したのは、CXCR2/CXCR1 の発現比率が高かったからかもしれない。更に、MMP9 は IL-8 を細胞外でプロセッシングする機能が知られている。ESCC 微小環境でも癌細胞と TAM の相互作用を出発点として MMP9 と IL-8 の相互作用が癌細胞の運動や浸潤を大いに促進する可能性を提唱した。

以上、本研究では TAM との直接接触が ESCC 細胞に MMP9 を発現誘導することが実験的及び免疫組織化学的に示された。更に ESCC 細胞の MMP9 発現が独立した無病生存期間不良因子であることを示した初の報告にもなった。本研究の成果は ESCC においても TAM や MMP9 を治療標的とする有用性を支持するものとみなされた。よって、本研究者は価値ある集積であり、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。